

Formulation contg. microparticles of polymer matrix contg. active agent**Publication number:** DE19542837**Publication date:** 1997-05-22**Inventor:** WINTER GERHARD DR (DE); KOLL HANS DIPL BIOL
DR (DE); KISSEL THOMAS PROF DR (DE); MORLOCK
MICHAEL (DE)**Applicant:** BOEHRINGER MANNHEIM GMBH (DE)**Classification:****- international:** **A61K9/16; A61K9/52; A61K38/18; A61K9/16;**
A61K9/52; A61K38/18; (IPC1-7): A61K38/17; A61K9/52;
A61K38/32**- European:** A61K9/16H6D; A61K9/16H6D4; A61K9/16H6F;
A61K9/16H6H; A61K38/18B**Application number:** DE19951042837 19951117**Priority number(s):** DE19951042837 19951117[Report a data error here](#)**Abstract of DE19542837**

Pharmaceutical compsn. is in the form of microparticles consisting of a polymeric matrix contg. an active ingredient (I) and additive (A). The matrix is an ABA triblock copolymer in which the A block is a lactic/glycolic acid copolymer and the B block is polyethylene glycol (PEG) chain. (I) is an aggregation-sensitive polypeptide and (A) is at least one of serum proteins, polyamino acids, cyclodextrins (or their derivs), saccharides, aminosaccharides, amino acids, detergents or carboxylic acids.

~~~~~  
Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide



①⑨ **BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES  
PATENTAMT**

⑫ **Offenlegungsschrift**  
⑩ **DE 195 42 837 A 1**

⑤① Int. Cl.<sup>6</sup>:  
**A 61 K 38/17**  
A 61 K 38/32  
A 61 K 9/52

②① Aktenzeichen: 195 42 837.4  
②② Anmeldetag: 17. 11. 95  
④③ Offenlegungstag: 22. 5. 97

**DE 195 42 837 A 1**

⑦① Anmelder:  
Boehringer Mannheim GmbH, 68305 Mannheim, DE

⑦② Erfinder:  
Winter, Gerhard, Dr., 69221 Dossenheim, DE; Koll,  
Hans, Dipl.-Biol. Dr., 82362 Weilheim, DE; Kissel,  
Thomas, Prof. Dr., 35032 Marburg, DE; Morlock,  
Michael, 68519 Viernheim, DE

⑤④ Polypeptid-enthaltende pharmazeutische Darreichungsformen in Form von Mikropartikeln und Verfahren zu deren Herstellung

⑤⑦ Die Erfindung betrifft Polypeptid-enthaltende parenterale pharmazeutische Darreichungsformen in Form von Mikropartikeln und Verfahren zu deren Herstellung. Erfindungsgemäß enthalten die Mikropartikel als bioabbaubares Polymer ein ABA-Triblock-Copolymer, dessen A-Block ein Copolymer aus Milch- und Glykolsäure ist und dessen B-Block eine Polyethylenglykol-Kette darstellt, zusammen mit Zuschlagstoffen, die ausgewählt sind aus der Gruppe Serumproteine, Polyaminosäuren, Cyclodextrine; Cyclodextrinderivate; Saccharide; Aminosucker; Aminosäuren; Detergenzien oder Carbonsäuren sowie Gemische dieser Zuschlagstoffe. Die erfindungsgemäßen Mikropartikel setzen auch bei Einschluß geringer bzw. aggregationsempfindlicher Polypeptidmengen das Polypeptid über einen längeren Zeitraum kontinuierlich frei.

**DE 195 42 837 A 1**

## Beschreibung

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind parenterale pharmazeutische Darreichungsformen in Form von Mikropartikeln (MP) zur kontrollierten Freisetzung von Polypeptiden und Verfahren zur Herstellung dieser Mikropartikel.

Durch das schnelle Fortschreiten der Entwicklung in der Biotechnologie stehen eine Vielzahl von bioaktiven Makromolekülen in ausreichender Menge zur klinischen Anwendung zur Verfügung. Bedingt durch ihre Struktur werden sie im Magen-Darm-Trakt hydrolytisch gespalten und können daher nur parenteral verabreicht werden. Wegen ihrer kurzen Halbwertszeit ist die Entwicklung von parenteralen Depotsystemen sinnvoll, um die Injektionshäufigkeit zu reduzieren und konstante Blutspiegel zu erreichen.

Es werden in der Fach- und Patentliteratur eine Reihe von Depotsystemen, insbesondere mikropartikuläre Systeme, beschrieben, um physiologisch aktive Substanzen nach parenteraler Applikation über einen längeren Zeitraum hinweg möglichst konstant freizusetzen. Dabei ist anzumerken, daß Proteine im Vergleich zu niedermolekularen Substanzen aufgrund ihrer komplexen Struktur, ihres hohen Molekulargewichtes und dem — bedingt durch ihre hohe biologische Wirksamkeit — geringen erforderlichen Beladungsgrad einige Besonderheiten aufweisen, die eine erfolgreiche Mikroverkapselung erschweren. So kann je nach Art der eingesetzten Mikroverkapselungsmethode die Proteinestabilität negativ beeinflusst werden und die Freigabe nicht optimal bzw. mit unbefriedigendem Freigabeprofil erfolgen. Das Freigabeverhalten wird einerseits durch das hohe Molekulargewicht und die hydrophile Struktur, andererseits aber auch durch Stabilitätsprobleme (u. a. Aggregation) des Proteins und dem niedrigen Beladungsgrad beeinflusst.

Eine der wichtigsten Herstellungsmethoden für Mikropartikel, wie zum Beispiel Mikrokapseln oder Mikroku-  
geln, ist das sogenannte "Tripelemulsionsverfahren", das auch bereits zur Mikroverkapselung von Proteinen Anwendung gefunden hat. Grundsätzlich wird bei dieser auch als W/O/W-Technik bezeichneten Methode der Wirkstoff in einer wäßrigen Lösung gelöst bzw. suspendiert, und diese wäßrige Lösung mit einer das Polymer enthaltenden öligen Lösung aus einem organischen, nicht mit Wasser mischbaren Lösungsmittel zu einer W/O-Emulsion homogenisiert. Diese W/O-Emulsion wird in eine wäßrige Stabilisator-haltige Lösung (äußere wäßrige Phase) dispergiert, so daß eine Emulsion mit drei Phasen (Tripelemulsion) entsteht. Mittels verschiedener Techniken wird dann die Verdunstung des Lösungsmittels und damit eine Aushärtung der Mikropartikel erreicht. Die gehärteten Mikropartikel werden durch Zentrifugieren und/oder Filtrieren gesammelt und nach Waschen mit Wasser oder geeigneten wäßrigen Lösungen und durch Lyophilisation oder Vakuumtrocknung bei Raumtemperatur getrocknet. Als Polymere werden in der Regel Polymere aus Milchsäure (LA = lactic acid) und Glykolsäure (GA = glycolic acid) oder deren Copolymere (PLGA) mit Molekulargewichten zwischen 2.000 und 100.000 und einem Verhältnis von Milchsäure:Glykolsäure zwischen 100 : 0 bis 50 : 50 eingesetzt.

Als problematisch kann sich bei der Anwendung des Tripelemulsionsverfahrens der Restlösungsmittelgehalt in den Mikropartikeln erweisen (R. Jalil und J.R. Nixon, J. Microencapsulation 7 (3), 1990, S. 297—325), da das als Polymerlösungsmittel am häufigsten verwendete Dichlormethan aus toxikologischer Sicht bedenklich erscheint. Aber auch aufgrund einer möglichen Beeinflussung der Polymer-Eigenschaften und der Wirkstoffstabilität in der Polymermatrix sollte der Restlösungsmittelgehalt möglichst gering sein.

Die Herstellung von Mikrokapseln mit Hilfe des Tripelemulsionsverfahrens wird z. B. in der europäischen Patentanmeldung EP 0 145 240 (Takeda) offenbart, wobei dort die innere wäßrige Phase eine Viskosität von mindestens 5.000 mPas besitzt bzw. völlig verfestigt ist. Die Erhöhung der Viskosität erfolgt durch Hilfsstoffe wie Gelatine, humanes Serumalbumin, Globulin, Casein, Collagen und Polyaminosäuren. In Anwendungsbeispielen wird die Mikroverkapselung von  $\gamma$ -Interferon bzw. Heparin beschrieben.

In der Patentschrift EP 0 190 833 (Takeda) wird das gleiche Herstellungsverfahren beschrieben, nur ist hier die Viskosität der W/O-Emulsion auf einen Wert zwischen 150—10.000 mPas einzustellen. Dies geschieht durch Variation der Polymer-Konzentration (PLGA 100/0—50/50) und dem Zusatz von natürlichen oder synthetischen hochmolekularen Verbindungen, wie z. B. Proteinen, Kohlenhydraten (Cellulose, Dextrin, Pektin, Stärke, Agar), Polyvinylverbindungen, Polycarbonsäuren oder Polyethylenverbindungen in die wäßrige Phase. Dadurch soll eine stark verminderte Aggregations- und Kohäsionsneigung der Mikropartikel während der Herstellung erreicht werden. In einem Anwendungsbeispiel wird Interferon alpha verkapselt.

In EP 0 442 671 (Takeda) werden bezüglich Aggregationsverhalten, sphärischer Gestalt der Mikropartikel und möglicher Zusätze ähnliche Angaben wie in EP 0 190 833 gemacht. "Arzneistoff-zurückhaltende Substanzen" sind gemäß Patentschrift nicht unbedingt erforderlich. Die in der Beschreibung näher erläuterten und konkret offenbarten Beispiele betreffen das kurzkettige und relativ stabile Peptid TAP144, das ein LHRH-Analogon darstellt.

Auch in der Fachliteratur sind Beispiele für die Mikroverkapselung von Peptiden bzw. Proteinen mit Hilfe der W/O/W-Technik publiziert.

So beschreiben Ogawa et al., Chem. Pharm. Bull. 1988, Vol. 36, Nr. 3, S. 1095—1103 die Mikroverkapselung von Leuprorelinacetat, einem Peptid, unter der Verwendung von PLA (Polymer aus Milchsäure) und PLGA und gehen auch auf das Freisetzungsverhalten des Peptids ein.

Cohen et al., Pharmaceutical Research 1991, Vol. 8, Nr. 6, S. 713 verkapselten FITC-Meerrettich-Peroxidase und FITC-B SA in PLGA-Mikropartikeln mit einem Molekulargewicht von 14.000 oder weniger und einem Anteil Milchsäure/Glykolsäure von 75/25 und fanden sowohl eine Unversehrtheit des Proteins BSA als auch einen Erhalt der Enzym-Aktivität. Jeffery H. et al. Pharmaceutical Research 1993, Vol. 10 Nr. 3, S. 362 benutzten Ovalbumin als Kernmaterial und konnten ebenfalls die Unversehrtheit des verkapselten Proteins zeigen. M. S. Hora et al., Biotechnology 1990, Vol. 8, S. 755 verwendeten Interleukin-2 und modifizierte Formen davon als Kernmaterial und untersuchten das Freisetzungsverhalten von PLGA-Mikropartikeln, die humanes Serumalbumin als Exzipiens enthielten.

Ferner beschreiben Youxin L. et al. im Journal of Controlled Release 32, (1994)121—128 Depotformen aus ABA-Triblock-Copolymeren (MW: 15 000—40 000), deren A-Block ein Copolymer aus Milch- und Glykolsäure ist und deren B-Block eine Polyethylenglykol-Kette (PEG) darstellt. Sie stellten fest, daß diese Mikropartikel das für Aggregation relativ unempfindliche bovine Serumalbumin, das als Modellprotein bei hohem Beladungsgrad (ca. 3—4% w/w) eingesetzt wurde, schnell und kontinuierlich über 2—3 Wochen freisetzen (Polymerzusammensetzung LA : GA : PEG = 48 : 14 : 38 [Mol%]). Die im Stand der Technik zur Herstellung von Mikrokapseln bisher häufig verwendeten PLGA-Polymere weisen aufgrund ihres hydrophoben Charakters als entscheidenden Nachteil eine geringe Quellfähigkeit auf, wodurch der Wassereintritt in das Innere der Depotform nur langsam erfolgen kann. Dadurch ist eine Diffusion der Proteinmoleküle durch die Polymerschichten nur erschwert möglich, was eine unbefriedigende Freisetzungsrates zur Folge hat. Dies ist insbesondere beim Einschluß sehr geringer Polypeptidmengen, d. h. bei niedrigem Beladungsgrad, in die Mikropartikel der Fall. Außerdem bewirkt die langsame Wasseraufnahme eine hohe lokale Proteinkonzentration, bezogen auf die verfügbare Wassermenge, wodurch eine Bildung von hochmolekularen Proteinaggregaten gefördert wird. Diese können wiederum wegen ihres hohen Molekulargewichtes nicht mehr freigesetzt werden. Eine therapeutisch zuverlässige Dosierung des Wirkstoffes ist dann nicht mehr gewährleistet. Ferner kann es bedingt durch den hohen Anteil der Proteinaggregate zu unerwünschten immunologischen Reaktionen kommen. Nur sehr stabile Proteine mit relativ hohen Beladungsgraden von beispielsweise mehr als 5% können mit akzeptabler Rate und ohne Bildung von Aggregaten über einen längeren Zeitraum hinweg freigesetzt werden.

Es zeigte sich ferner, daß auch hydrophile ABA-Triblock-Copolymere eine kontinuierliche Freisetzung von Polypeptiden über einen Zeitraum von zwei Wochen dann nicht gewährleisten können, wenn der Polypeptidgehalt in den Mikropartikeln sehr gering ist, d. h. wenn der Beladungsgrad niedrig ist. Ein niedriger Beladungsgrad liegt dann vor, wenn nur geringe Polypeptidmengen im Polymer eingeschlossen sind. Ein ähnliches nachteiliges Verhalten in der Freisetzung ist festzustellen, wenn aggregationsempfindliche Polypeptide verwendet werden. In diesen Fällen werden auch mit dem hydrophilen ABA-Triblock-Copolymer eine verstärkte Aggregatbildung und inakzeptable Freisetzungseiträume von weniger als zwei Wochen beobachtet. Dies führt insgesamt zu unbefriedigenden Freigaberraten des Wirkstoffes aus dem Polymer.

Aufgabe der Erfindung war es, Polypeptid-enhaltende Mikropartikel herzustellen, in denen die Aggregation des Wirkstoffes auch für aggregationsempfindliche Polypeptide möglichst gering gehalten bzw. weitgehend vermieden werden soll, und so das Polypeptid in einer möglichst unversehrten Form in den Mikropartikeln enthalten ist. Die Mikropartikel sollen eine kontinuierliche Freisetzung der Polypeptide über einen Zeitraum von mindestens zwei Wochen gewährleisten. Dies sollte vor allem bei solchen Mikropartikeln erzielt werden, die einen niedrigen Beladungsgrad an Wirkstoff aufweisen. Insbesondere sollten diese Freisetzungseiträume für geringe Polypeptidmengen von bis zu etwa 3% (bezogen auf die Gesamtmikropartikelmenge) gelten.

Daneben war es Aufgabe der Erfindung, ein Mikroverkapselungsverfahren bereitzustellen, mit dem diese gewünschten Mikropartikel herstellbar sind und das einen toxikologisch unbedenklichen Restlösungsmittelgehalt in den Mikropartikeln gewährleistet.

Die Aufgabe der Erfindung wird gelöst durch Mikropartikel, die aus einer bioabbaubaren Polymermatrix bestehen, in die das Polypeptid eingebettet ist, wobei als Polymer ein ABA-Triblock-Copolymer verwendet wird, dessen A-Block ein Copolymer aus Milch- und Glykolsäure ist und dessen B-Block eine Polyethylenglykol-Kette darstellt, und die Zuschlagstoffe enthalten, die ausgewählt sind aus der Gruppe Serumproteine, Polyaminosäuren, Cyclodextrine; Cyclodextrinderivate, Saccharide, wie z. B. Di- und Polysaccharide, Aminosucker, Aminosäuren, Detergenzien, organische Carbonsäuren sowie Chemische dieser Zuschlagstoffe.

Als Saccharide kommen beispielsweise die Disaccharide Trehalose, Saccharose, Maltose, in Frage. Polysaccharide sind beispielsweise Raffinose, Stärke, Maltodextrine, Alginate oder Dextran. Ein geeigneter Aminosucker ist beispielsweise das Chitosan. Ein bevorzugtes Cyclodextrinderivat im Sinne der Erfindung ist beispielsweise das Beta-Hydroxypropyl-Cyclodextrin (HPCD). Als Serumproteine kommen insbesondere Humanserumalbumin und bovines Serumalbumin in Frage.

Als organische Carbonsäuren kommen aliphatische und cyclische Monocarbonsäuren in Frage, beispielsweise Benzoesäure, Essigsäure, Propionsäure, Buttersäure, Isobuttersäure, Valeriansäure, Acrylsäure, Crotonsäure sowie deren durch Hydroxygruppen substituierten Derivate, wie z. B. p-Hydroxybenzoesäure,  $\beta$ -Hydroxybuttersäure, Salicylsäure, Milchsäure oder Glykolsäure. Insbesondere eignet sich Benzoesäure. Die Carbonsäuren werden im Rahmen der Herstellung der Mikropartikel im wesentlichen der organischen Phase (Polymerphase) zugesetzt, in der das Polymer gelöst oder suspendiert ist. Die zugesetzte Menge an Carbonsäuren bewegt sich im Bereich von bis zu 30 Gew.-%, bezogen auf die Menge der fertigen Mikropartikel, vorzugsweise bis zu 20 Gew.-%, insbesondere 1—15 Gew.-%. Die Verwendung von Monocarbonsäuren, wie z. B. Benzoesäure, als Zuschlagstoff bewirkt überraschenderweise eine Verbesserung der Freisetzung der Polypeptide aus den Mikropartikeln. Ein durch den Zusatz von Carbonsäuren zu erwartender beschleunigter Polymerabbau konnte dabei im Falle der ABA-Triblock-Copolymere nicht festgestellt werden.

Vorteilhaft im Sinne der Erfindung sind auch Gemische der zuvor genannten Zuschlagstoffe. Beispielfhaft seien erwähnt Gemische aus Dextranen und Polyaminosäuren. So sind z. B. Gemische aus Dextran und Poly-L-Arginin oder Dextran und Poly-L-Histidin besonders vorteilhaft in Bezug auf die Erniedrigung der Aggregatbildung des Polypeptides im Mikropartikel. Bevorzugt als Zuschlagstoffe sind auch Gemische aus Cyclodextrinen oder Cyclodextrinderivaten mit Aminosäuren oder Polyaminosäuren. Auch Detergenzien wie beispielsweise Tween 20®, Tween 80®, Pluronic® oder Miglyol® sind als Zuschlagstoffe im Sinne der Erfindung geeignet.

Als Polyaminosäuren kommen sowohl die entsprechenden (D) oder (L) bzw. Poly-(D,L)-aminosäuren in Frage. Besonders bevorzugt ist Polyarginin mit einem Molekulargewicht von 5.000—150.000, insbesondere 5.000 bis 50.000, sowie Polyhistidin mit einem Molekulargewicht von 5.000—50.000, insbesondere 15.000—50.000.

Mit den genannten erfindungsgemäßen Zuschlagstoffen ist es möglich, den Gesamttaggregat-Anteil des Poly-

peptides unter 5% zu senken.

Als Polypeptide kommen im Sinne der Erfindung physiologisch aktive Polypeptide mit einem Molekulargewicht zwischen 2.000 bis 200.000, vorzugsweise von mindestens 5.000 oder 10.000, und insbesondere bis zu 100.000, bzw. 50.000 in Frage. Solche Polypeptide sind insbesondere biologisch aktive Makromoleküle, deren Muteine, Analoga, sowie Deletions- oder Substitutionsvarianten. Folgende Polypeptide werden beispielhaft erwähnt: Erythropoietin (EPO), Parathormon (PTH), G-CSF, TNF oder EGF, sowie deren durch Deletionen oder Substitutionen in der Aminosäurekette ableitbaren Derivate. Weitere Polypeptide sind: Interferone ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ -Interferon), Kolonie stimulierende Faktoren, Interleukine, Makrophagen aktivierende Faktoren, B-Zell-Faktoren, T-Zell-Faktoren, Immunotoxine, Lymphotoxine, TGF, Thrombopoietin (TPO), Renin-Inhibitoren, Collagenase-Inhibitoren, EGF, Wachstumshormone, PDGF, Knochenwachstumsfaktoren, BMP (bone morphogenic proteins), Insulin, IGF-BP (insulin-like growth factor binding proteins), ANP (atrial natriuretic peptides), Calcitonin, FSH, LH, NGF, Glukagon, TSH (thyroid stimulating hormone), monoklonale oder polyklonale Antikörper. Besonders geeignete Polypeptide sind im Sinne der vorliegenden Erfindung aggregationsempfindliche Polypeptide, wie beispielsweise EPO.

Der Polypeptidgehalt in den Mikropartikeln beträgt zwischen 0,01 bis 5 Gew.-%, bezogen auf die Gesamtmi-kropartikelmenge. Bevorzugt beträgt der Beladungsgrad 0,1–3 Gew.-%, insbesondere 0,1–2 Gew.-%, und bevorzugt 0,1–1 Gew.-%. Insbesondere können Mikropartikel mit einem sehr geringen Beladungsgrad von bis zu 1 Gew.-% hergestellt werden. Für aggregationsempfindliche Proteine beträgt der bevorzugte Beladungsgrad 0,1–1%, 0,1–insbesondere 0,2–0,6%. Als untere Grenze kommt ein Beladungsgrad von etwa 0,01, 0,05 bzw. 0,1 Gew.-% in Frage. Die Menge des in den Mikropartikeln enthaltenen Wirkstoffes ist abhängig von der in jedem Einzelfall zu bestimmenden Dosierung und der therapeutischen Breite des jeweiligen Wirkstoffes. Im Falle von EPO beträgt die Menge an Wirkstoff etwa 10  $\mu$ g–100  $\mu$ g pro 10 mg Mikropartikelmenge. Insbesondere werden etwa 10–70  $\mu$ g, bevorzugt 30–50  $\mu$ g eingesetzt. Bei einer spezifischen Aktivität von EPO von etwa 160.000 U/mg entspricht dies einer Dosierung von 1.600–16.000 U pro 10 mg Mikropartikelmenge (10–100  $\mu$ g pro 10 mg Mikropartikelmenge). Bevorzugt wird die zu verabreichende Mikropartikelmenge an der gewünschten Dosierung von EPO (in U) festgelegt. Wenn beispielsweise der Beladungsgrad 0,4% beträgt (entspricht 40  $\mu$ g EPO pro 10 mg Mikropartikel) und die Dosierung von EPO 20.000 U (entspricht 125  $\mu$ g EPO) betragen soll, ist eine Mikropartikelmenge von 31,25 mg zu verabreichen. Diese Menge entspricht einer voraussichtlichen Monatsdosis von EPO im DDS-System.

Überraschenderweise wurde gefunden, daß die Verwendung von ABA-Triblock-Copolymeren in Kombination mit Zuschlagstoffen eine kontinuierliche Freigabe der Polypeptide über einen längeren Zeitraum hinweg – mindestens jedoch zwei Wochen – ermöglicht, und durch die Zuschlagstoffe ein erheblicher aggregationsmindernder Effekt erreicht wird. Erfindungsgemäß kommen ABA-Blockpolymere in Frage, deren A-Block ein Molekulargewicht zwischen 2.000 und 150.000 besitzt, und deren B-Block ein Molekulargewicht zwischen 1.000 und 15.000 besitzt. Insbesondere weist der B-Block ein Molekulargewicht zwischen 3.000 bis 10.000 auf. Besonders bevorzugt sind ABA-Blockpolymere mit einem Molekulargewicht von 5.000–50.000 Dalton, vorzugsweise 10.000–30.000, und einer Polydispersität von 1,1–8,5 oder 1,1–5,5, vorzugsweise 1,5–4,5 und insbesondere bevorzugt von 2–4.

Tabelle 5 gibt eine Übersicht über die erfindungsgemäß verwendbaren ABA-Copolymere, die sich in ihrer Zusammensetzung bezüglich des Laktid/Glykolid/PEG-Anteils, dem Molekulargewicht und der Polydispersität unterscheiden. Erfindungsgemäß beträgt der Polyethylenglykolanteil (PEG-Anteil) im Blockpolymer 20 bis 50 Mol.-%, bezogen auf die Gesamtpolymermenge, vorzugsweise 25 bis 45 Mol.-%. Als besonders vorteilhaft für die Freigabedauer und für die kontinuierliche Freisetzung des Wirkstoffes hat sich ein PEG-Anteil von 30 bis 40 Mol.-%, insbesondere 30 bis 38 Mol.-%, bevorzugt 30 bis 35 Mol.-% erwiesen. Bevorzugt beträgt der prozentuale Gehalt von PEG im ABA-Blockcopolymer etwa 32 oder 33 Mol.-%.

Der prozentuale Gehalt von LA im ABA-Blockcopolymer beträgt vorzugsweise 40 bis 60 Mol.-%, insbesondere 45–60 Mol.-%. Bevorzugt sind Molprozentanteile von etwa 46%, 51% oder 57%. Der prozentuale Gehalt von GA im ABA-Blockcopolymer beträgt vorzugsweise 5 bis 25%, insbesondere 10 bis 25%. Bevorzugte Prozentangaben sind etwa 11%, 16% oder 22%.

Das Verhältnis von Milchsäure zu Glykolsäure im Blockpolymer liegt zwischen 1 : 1 bis 5 : 1 insbesondere beträgt es zwischen 1,5 : 1 bis 4,5 : 1. Besonders bevorzugt ist ein Verhältnis LA/GA von etwa 2 : 1 bis 4 : 1. Erfindungsgemäß besonders bevorzugte ABA-Triblock-Copolymere sind Polymere mit einem Verhältnisanteil von LA/GA = 4 : 1 und einem Polyethylenglykolgehalt von 30–38%. Insbesondere kommt ein Polymer mit einem Verhältnisanteil LA : GA : PEG = 57 : 11 : 32; 51 : 16 : 33; 50 : 12 : 38 oder 46 : 22 : 32 in Frage.

Die letztgenannten Polymermodifikationen bieten ein Optimum an Abbaugeschwindigkeit und PEG-Gehalt. Ein höherer PEG-Gehalt führt zwar zu einem noch schnelleren Abbau, andererseits aber auch zu einer Verschlechterung der mechanischen Eigenschaften der Mikropartikel und möglicherweise auch zu Wechselwirkungen zwischen PEG und Polypeptid.

Die Herstellung der ABA-Triblock-Copolymere ist bekannt und kann, wie im "Journal of Controlled Release 27, 1993, 247–257" beschrieben, durchgeführt werden.

Überraschend wurde gefunden, daß die erfindungsgemäßen Zuschlagsstoffe neben ihrem aggregationsmindernden Effekt eine signifikante Erhöhung der Freisetzungsdauer bewirken können, verglichen mit ABA-Mikropartikeln ohne Zuschlagsstoffe. Dies gilt insbesondere für die erfindungsgemäßen Serumproteine, die eine Erhöhung der Freisetzungsdauer des Polypeptids auf beispielsweise bis zu 29 Tagen hervorruft (vgl. Beispiel 4).

Als Serumproteine werden bevorzugt bovines oder humanes Serumalbumin eingesetzt. Werden die erfindungsgemäßen Zuschlagsstoffe, insbesondere BSA und Beta-Hydroxypropyl-Cyclodextrin, PLGA-Mikropartikeln zugesetzt, so tritt ebenfalls ein aggregationsmindernder Effekt und somit eine Stabilisierung der aggregationsempfindlichen Polypeptide ein.

Derartig lange Freisetzezeiträume von bis zu 29 Tagen sind von Polypeptiden aus Mikropartikeln auf Basis von PLGA oder ABA-Triblock-Copolymeren bislang nur bei hohem Beladungsgrad bekannt, jedoch nicht für solche Fälle, in denen die Wirkstoffmenge in den Mikropartikeln sehr gering ist, wie beispielsweise im Fall von EPO. Wird EPO in einem höheren Beladungsgrad (z. B. ca. 3%) in den ABA-Mikropartikeln eingeschlossen, wird das Protein über 29 Tage freigesetzt (s. Tab. 4 B). Insbesondere konnte festgestellt werden, daß eine verlängerte Freisetzung erzielt wird, falls eine Monocarbonsäure, insbesondere Benzoesäure, der Polymerphase bei der Herstellung der Mikropartikel zugesetzt wird. Dies gilt insbesondere im Fall von niederen Beladungsgraden von bis zu 3%.

Die erfindungsgemäßen Mikropartikel können als Zuschlagstoffe auch Aminosäuren wie z. B. Arginin, Glycin, Lysin oder Phenylalanin, Cyclodextrine oder Cyclodextrinderivate wie z. B. Beta-Hydroxypropyl-Cyclodextrin (HPCD) enthalten. Ebenso können erfindungsgemäß als Zuschlagstoffe Polyaminosäuren wie z. B. Polyarginin oder Polyhistidin eingesetzt werden oder auch Gemische aus Cyclodextrinen oder Cyclodextrinderivaten mit Aminosäuren oder Polyaminosäuren wie z. B. HPCD mit Polyarginin. Auch Gemische aus Dextranen mit Cyclodextrinderivaten, z. B. mit HPCD, oder mit Cyclodextrinen finden Verwendung. Die verwendeten Dextrane besitzen ein Molekulargewicht zwischen 20.000 und 60.000, besonders bevorzugt ist Dextran 40.000.

Neben den Serumproteinen werden erfindungsgemäß als Zuschlagstoffe Gemische aus Dextranen und Polyarginin oder Gemische aus Dextranen und Polyhistidin besonders bevorzugt eingesetzt.

Die erfindungsgemäßen Mikropartikel enthalten die Zuschlagstoffe in einer Menge von 0,5–40 Gew.-%, bezogen auf die Gesamtmikropartikelmenge, vorzugsweise von 1–30%. Insbesondere bevorzugt sind 1–20 Gew.-%. Im Fall der Saccharide werden vorzugsweise Mengen von 5–15 Gew.-% eingesetzt. Im Fall der Polyaminosäuren beträgt die Menge der Zuschlagstoffe insbesondere 1–5 Gew.-%. Cyclodextrin und Cyclodextrinderivate werden vorzugsweise in einer Menge von 2–20 Gew.-% zugesetzt. Die Menge an BSA oder HSA beträgt bevorzugt 2–20 Gew.-% bezogen auf das Gesamtpartikelgewicht. Die Menge an Carbonsäuren beträgt insbesondere bis zu 15%, bevorzugt etwa 10%.

Die Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Herstellung von Polypeptid enthaltenden Mikropartikeln mit Hilfe des Tripelemulsionsverfahrens, das dadurch gekennzeichnet ist, daß das bei der Herstellung der "öiligen" bzw. organischen Phase durch Lösen eines Polymers in einem organischen, nicht wassermischbaren Lösungsmittel als Polymer ein ABA-Triblock-Copolymer eingesetzt wird, dessen A-Block ein Copolymer aus Milch- und Glykolsäure ist und dessen B-Block eine Polyethylenglykol-Kette darstellt und dem wäbrig gelösten Polypeptid, das in der organischen Phase emulgiert wird, Zuschlagstoffe zugesetzt werden, die ausgewählt sind aus der Gruppe Serumproteine, Polyaminosäuren, Cyclodextrine; Cyclodextrinderivate; Saccharide, wie z. B. Di- und Polysaccharide; Aminosucker; Aminosäuren; Detergenzien oder Carbonsäuren sowie deren Gemische.

Es hat sich gezeigt, daß der erste Homogenisierungsschritt (Bildung der W/O-Emulsion) offensichtlich für die Bildung von Polypeptid-Aggregaten besonders verantwortlich zu sein scheint. Erfindungsgemäß wurde deshalb die Dispergierzeit von 60 auf 30 Sekunden verkürzt, als Homogenisator ein Ultra-Turrax eingesetzt und das Volumenverhältnis Wasser/organische Phase (bevorzugt Dichlormethan) von 5 auf 20% erhöht. Vorzugsweise wird im ersten Homogenisierungsschritt zweimal etwa 30 Sekunden, mit einer Pause von etwa 30 Sekunden, dispergiert. Besonders vorteilhaft wird einmal etwa 30 Sekunden lang dispergiert. Durch diese Modifizierung der Herstellungsbedingungen konnte eine leichte Abnahme des Aggregatanteils erreicht werden.

Das Volumenverhältnis Wasser/organische Phase von 20-25% (3–4 Teile organisches Lösungsmittel/1 Teil Wasser) ermöglicht außerdem das Einbringen einer größeren Menge von Zuschlagstoffen in die innere wäbrige Phase.

Die erfindungsgemäßen Mikropartikel besitzen überraschenderweise auch einen äußerst geringen Restlösungsmittelgehalt. Die mit ABA-Polymer hergestellten Mikropartikel enthalten weniger als 1%, vorzugsweise weniger als 0,1%, insbesondere weniger als 0,01% Restlösungsmittel, wie z. B. Dichlormethan. Offensichtlich wurde durch die gewählten Prozeßparameter eine nahezu vollständige Entfernung des Dichlormethans aus den entstehenden Mikropartikeln erreicht, was vor allem auf das günstige Volumen-Verhältnis der organischen zur äußeren wäbrigen Phase zurückzuführen ist.

Um den Einfluß von Restwasser auf die Proteinstabilität auszuschließen, wurde auch der Restwassergehalt in den Mikropartikeln bestimmt. Der ermittelte Wassergehalt von 0,2% zeigte, daß der Wasseranteil der eingesetzten inneren wäbrigen Phase fast vollständig entfernt werden konnte.

Untersuchungen zur Lagerstabilität der erfindungsgemäßen Mikropartikel haben gezeigt, daß diese mindestens 2 Monate bei Raumtemperatur (20–25°C) lagerstabil sind und keine Veränderungen hinsichtlich der Aggregat-Bildung und dem Freisetzungsverhalten auftreten.

Gegenstand der Erfindung ist weiterhin die Verwendung von pharmazeutischen Zuschlagstoffen ausgewählt aus der Gruppe Serumproteine, Polyaminosäuren; Cyclodextrine; Cyclodextrinderivate; Saccharide; Aminosucker; Aminosäuren; Detergenzien sowie Gemische dieser Zuschlagstoffe zur Vermeidung der Aggregatbildung von aggregationsempfindlichen Polypeptiden bei der Herstellung von Polypeptid-enthaltenden Mikropartikeln.

In den folgenden Ausführungsbeispielen wird die Erfindung näher erläutert, ohne sie darauf zu beschränken.

#### Beispiel 1

#### Verfahren zur Herstellung von Mikropartikeln enthaltend EPO (W/O/W-Methode)

Ein D,L-PLGA-Polymer (LA : GA = 50 : 50; RG503) wurde von Boehringer Ingelheim bezogen und ein ABA-Copolymer (LA : GA : PEG = 50 : 12 : 38) wurde wie in "Journal of Controlled Release 27 1993 247–257" beschrieben, hergestellt.

Es wurde je eine Lösung aus dem D,L-PLGA- und ABA-Block-Polymer in Dichlormethan hergestellt, indem

700 mg des Polymers in 2,5 ml Dichlormethan gelöst wurden. 3,5 mg EPO (in 0,2 ml Natrium-Phosphat-Puffer, pH 7,4) werden je nach Bedarf mit Zuschlagsstoffen (1%–20 Gew.% bezogen auf die Gesamtmikropartikelmenge) versetzt und mit Wasser auf 0,8 ml Endvolumen aufgefüllt.

Die wäßrige EPO-Lösung wird zur Polymerlösung gegeben und mit Hilfe eines Ultra-Turrax (30 Sekunden, 30s Pause, erneut 30s, 20–24°C, 20.000 U) eine W/O-Emulsion hergestellt. Anschließend wird die W/O-Emulsion durch Einspritzen in 300 ml wäßrige 0,1% PVA-Lösung mit Hilfe eines Ultra-Turrax bei 8000 U/min für 30 Sekunden dispergiert (Herstellung einer W/O/W-Tripelemulsion).

Die W/O/W-Emulsion wird zur Verdunstung der organischen Dichlormethanphase für 2 bis 3 Stunden bei Raumtemperatur mit Hilfe eines Flügelrührers gerührt (solvent evaporation). Die gebildeten und gehärteten MP werden durch Abnutschen isoliert, zweimal mit je 200 ml Wasser gewaschen und lyophilisiert. Die Mikropartikel werden in einem Exsikkator über Blaugel bei 4°C – 8°C gelagert.

## Beispiel 2

### 15 Stabilisierung von EPO-haltigen Mikropartikeln

Es wurden nach herkömmlichen Methoden, wie in Beispiel 1 beschrieben, Mikropartikel hergestellt, wobei unterschiedliche Zuschlagsstoffe in unterschiedlichen Mengen, bezogen auf die Gesamtmikropartikelmenge, eingesetzt wurden.

20 Die Aggregatbildung des Wirkstoffes EPO wurde anschließend mittels SDS-PAGE nach der Extraktion von EPO aus den Mikropartikeln (a) oder der Solvation der Mikropartikel in DMSO oder DMSO/DMF-Gemisch (30 : 70) (b) folgendermaßen bestimmt:

25 a) 10 mg MP wurden in 300 ml  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  gelöst und EPO durch Zugabe von 700 ml Aceton ausgefällt. Das EPO-Präzipitat wurde abzentrifugiert, 2x mit 1 ml  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /Aceton-Gemisch (1 : 3) gewaschen und anschließend in der speed vac getrocknet. Der Niederschlag wurde in Probenpuffer für SDS-PAGE gelöst, auf ein 12,5 oder 15%-iges SDS-Gel geladen und einer Elektrophorese unterzogen.

b) 10 mg MP wurden in 200 µl DMSO/DMF (30 : 70) gelöst. 25 µl (entspricht ca. 5 µg EPO) wurden direkt auf ein 15%-iges SDS-Gel geladen und einer Elektrophorese unterzogen.

30 Nach Abschluß der Elektrophorese wurden die Gele entweder:

- aa) mit Coomassie angefärbt und mittels eines Laserscanners densitometrisch vermessen, oder
- bb) auf Nitrocellulose geblottet, mittels eines EPO-spezifischen Antikörpers die EPO-haltigen Banden angefärbt und mittels eines Laserscanners densitometrisch vermessen.

35 Es zeigte sich, daß in ABA-Mikropartikeln (LA : GA : PEG = 50 : 12 : 38) der EPO-Gesamt-Aggregat-Anteil von ca. 15–30% durch den Einschluß von BSA auf unter 1% verringert werden konnte. Weiterhin zeigten Poly-L-Arginin bzw. Poly-L-Histidin, auch in Kombination mit Dextran 40.000 eine deutliche Aggregat-reduzierende Wirkung. Diese Zuschlagstoffe wurden in einer Menge von 1 bis 10 Gew.-% bezogen auf die Gesamtmikropartikelmenge, eingesetzt (vgl. Tabelle 1).

40 Auch in EPO-PLGA-Mikropartikeln wird durch Zuschlagstoffe eine Aggregat-Reduzierung erreicht. Hier erwiesen sich insbesondere BSA und  $\beta$ -Hydroxy-Propyl-Cyclodextrin als äußerst wirkungsvoll (Aggregatanteil unter 1%) (vgl. Tabelle 2). In den Mikropartikeln mit PEG als Zuschlagstoff wurde dagegen ein Anstieg des Aggregatanteils festgestellt. Daneben wurde bei PEG bzw. Pluronic F127 haltigen Mikropartikeln mit mindestens 4% Hilfsstoffanteil ein vermehrtes Auftreten deformierter Mikropartikel beobachtet.



Tabelle 1

Zuschlagstoffe und ihr Einfluß auf die Aggregat-Situation

| Zuschlagsstoff               | % ww<br>vom Gesamt-<br>partikel | Aggregation<br>↑ = erhöht<br>- = unverändert<br>↓ = erniedrigt |
|------------------------------|---------------------------------|----------------------------------------------------------------|
| ohne                         |                                 | -                                                              |
| bovines Serumalbumin         | 5                               | ↓↓↓                                                            |
| bovines Serumalbumin         | 10                              | ↓↓↓                                                            |
| Dextran 40.000               | 5                               | ↓                                                              |
| Dextran 20.000               | 5                               | -                                                              |
| Poly-L-Arginin               | 1-5                             | ↓↓                                                             |
| Poly-L-Histidin              | 1-5                             | ↓↓                                                             |
| Poly-L-Arginin               | 2,5                             | ↓                                                              |
| β-Hydroxypropyl-Cyclodextrin | 2,5                             |                                                                |
| Dextran 40.000               | 2,5                             | ↓↓                                                             |
| β-Hydroxypropyl-Cyclodextrin | 2,5                             |                                                                |
| Poly-L-Arginin               | 1-5                             | ↓↓                                                             |
| Dextran 40.000               | 5                               |                                                                |
| Poly-L-Histidin              | 1-5                             | ↓↓                                                             |
| Dextran 40.000               | 5                               |                                                                |
| β-Hydroxypropyl-Cyclodextrin | 5-15                            | ↓                                                              |
| Arginin                      | 5                               | ↓                                                              |
| Benzoessäure                 | 10                              | -                                                              |
| Tween 20                     | 0,5                             | ↓                                                              |
| Pluronic F68                 | 0,5                             | ↓                                                              |
| Pluronic F127                | 0,5                             | ↓                                                              |
| Zum Vergleich:               | Δ                               | ↑↑                                                             |
| 100 mM Na-Phosphat           | 15                              |                                                                |



Tabelle 2

Zuschlagstoffe und ihr Einfluß auf die Aggregat-Situation in PLGA-Mikropartikeln

| Zuschlagsstoff       | % ww<br>vom Gesamt-<br>partikel | Aggregation<br>↑ = erhöht<br>- = unverändert<br>↓ = erniedrigt | initialer Burst<br>[%] |
|----------------------|---------------------------------|----------------------------------------------------------------|------------------------|
| BSA                  | 5                               | ↓↓                                                             | 40                     |
| BSA                  | 10                              | ↓↓                                                             | 40                     |
| CD                   | 5                               | ↓↓                                                             | 30                     |
| CD                   | 10                              | ↓↓                                                             | 40                     |
| CD                   | 15                              | ↓↓                                                             | 40                     |
| CD/PEG 10.000        | 5/5                             | ↓                                                              | 7                      |
| CD/Pluronic F127     | 5/5                             | ↓                                                              | 8                      |
| CD/Trehalose         | 5/5                             | ↓                                                              | 30                     |
| Dextran 40.000       | 5                               | ↓                                                              | 10                     |
| D40/Poly-(L)-Arginin | 5/1                             | ↓                                                              | n.b.                   |
| Arginin              | 0,2                             | ↓                                                              | 15                     |
| Arginin              | 4,8                             | ↓                                                              | 18                     |
| PEG 1.550            | 0,43                            | —                                                              | 12                     |
| PEG 1.550            | 4,3                             | ↑                                                              | 1.3                    |
| PEG 10.000           | 10                              | ↑                                                              | 0.6                    |
| PEG 35.000           | 10                              | ↑                                                              | n.b.                   |
| Pluronic F127        | 10                              | ↓                                                              | 20                     |

n.b. : nicht bestimmt

## Beispiel 3

Einfluß von Zuschlagstoffen auf die Freisetzung von EPO aus PLGA-Mikropartikeln

Es wurden Mikropartikel auf Basis von D,L-PLGA-Polymeren (RG503, MG = 40 000; LA : GA = 50 : 50; Polydispersität 2,4) mit einem Wirkstoffgehalt von EPO von 0,5% (bezogen auf die Gesamtmikropartikelmenge) gemäß Beispiel 1 hergestellt, wobei bei der Herstellung unterschiedliche Zuschlagstoffe (% w/w bezogen auf die Gesamtmikropartikelmenge) eingesetzt wurden.

Die Bestimmung der Freisetzungsrates (in % der verkapselten Wirkstoffmenge/pro Tag) erfolgte folgendermaßen:

Jeweils 15 mg Mikropartikel wurden in 2 ml Eppendorfgefäßen eingewogen und mit 1,5 ml PBS-Puffer und 0,01% Tween 20, pH 7,4 versetzt. Diese Röhren wurden in einem auf 37°C thermostatierten, rotierenden Metallblock (Rotatherm, Fa. Liebisch, 30 U/Min.) gestellt. Nach den vorgegebenen Probenahmezeiten wurden die Proben gezogen und das verbleibende Freigabemedium jeweils vollständig durch neues Medium ausgetauscht. Es wurden die Freisetzungsrates für folgende Mikropartikel bestimmt:

Tabelle 3

In-vitro-Freisetzung von EPO aus PLGA (50 : 50)-Mikropartikeln

Freisetzung in %/Tag (bezogen auf die in den MP vorhandene EPO-Gesamtmenge)

| Tag:                        | 1   | 2   | 3    | 7 | 11 | 14 | 18 | 21 | 25 | 29 |
|-----------------------------|-----|-----|------|---|----|----|----|----|----|----|
| Zuschlagsstoff              |     |     |      |   |    |    |    |    |    |    |
| ohne                        | 29  | -   | -    | - | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| 10 % BSA                    | -   | -   | -    | - | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| 10 % HPCD                   | 36  | -   | -    | - | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| 5 % Arg                     | 19  | 0,1 | 0,05 | - | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| 5 % Dextr 40                | 9,2 | 0,2 | -    | - | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| 5 % Dextr 40<br>1 % Polyarg | 5,7 | 0,3 | -    | - | -  | -  | -  | -  | -  | -  |

Dextr 40: Dextran 40.000

Polyarg: Polyarginin

Arg: Arginin

HPCD:  $\beta$ -Hydroxypropyl-Cyclodextrin

BSA: bovines Serumalbumin

Aus diesen Ergebnissen wird deutlich, daß in PLGA-Mikropartikeln unabhängig von den Zusatzstoffen die EPO-Freisetzung nur maximal 24–36 Stunden andauert und dann keine weitere kontinuierliche Freisetzung erfolgt. Durch die Zuschlagstoffe wird lediglich die Höhe des initialen Burst verändert. Eine protahierte Freigabe des EPO konnte mit den Zuschlagstoffen nicht erreicht werden.

Beispiel 4

Einfluß von Zuschlagstoffen auf die Freisetzung von EPO aus ABA-Mikropartikeln

Es wurden Mikropartikel auf Basis von ABA-Triblock-Copolymeren mit LA : GA : PEG = 57 : 11 : 32 (Polymer A) und LA : GA : PEG = 50 : 12 : 38 (Polymer B) mit einem Wirkstoffgehalt von EPO von jeweils 0,5 Gew.-% (bezogen auf die Gesamtmikropartikelmenge) gemäß Beispiel 1 hergestellt, wobei unterschiedliche Zuschlagstoffe (% w/w bezogen auf die Gesamtmikropartikelmenge) eingesetzt wurden. Die Bestimmung der Freisetzungsraten wurde wie in Beispiel 3 beschrieben durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4A zusammengefaßt. Die Polymere A und B waren hinsichtlich des Freisetzungsverhaltens des Wirkstoffes qualitativ weitgehend vergleichbar.

Tabelle 4A

In-vitro-Freisetzung von EPO aus ABA-Mikropartikeln (bei 0,5% Beladungsgrad)

Freisetzung in % / Tag (bezogen auf die in den MP vorhandene EPO-Gesamtmenge)

| Tag:                        | 1    | 2   | 3    | 7    | 11   | 14   | 18   | 21   | 25   | 29   |
|-----------------------------|------|-----|------|------|------|------|------|------|------|------|
| <b>Zuschlagsstoff</b>       |      |     |      |      |      |      |      |      |      |      |
| ohne                        | 12,7 | 1,8 | 0,5  | 0,26 | 0,02 | -    | -    | -    | -    | -    |
| 5 % BSA                     | 4,6  | 1,6 | 0,5  | 0,4  | 0,12 | 0,06 | 0,07 | 0,04 | 0,03 | 0,04 |
| 10 % BSA                    | 3,7  | 1,6 | 0,4  | 0,4  | 0,25 | 0,14 | 0,11 | 0,08 | 0,04 | 0,04 |
| 5 % Dextr 40                | 9,0  | 1,1 | n.d. | 0,85 | 0,3  | 0,22 | 0,1  | -    | -    | -    |
| 5 % Dextr 40<br>1 % Polyarg | 17,0 | 3,0 | n.d. | 2,8  | 1,3  | 0,34 | 0,17 | -    | -    | -    |
| 10% Benzoessäure*           | 18,4 | 3,9 | 3,4  | 2,5  | 1,3  | 0,7  | 0,2  | 0,1  | -    | -    |
| 10 % HPCD                   | 23,2 | 3,1 | 2,0  | 1,2  | 0,5  | 0,12 | 0,07 | -    | -    | -    |
| 5 % Arg                     | 38   | 4,5 | 3,5  | 0,7  | 0,3  | 0,03 | 0,02 | -    | -    | -    |

Dextr 40: Dextran 40 000

Polyarg: Polyarginin

Arg: Arginin

HPCD:  $\beta$ -Hydroxypropyl-Cyclodextrin

BSA: bovines Serumalbumin

n.d. nicht bestimmt

\* Zuschlagstoff in die Polymerphase gegeben

Aus Tabelle 4A wird deutlich, daß im Gegensatz zu den PLGA-Mikropartikeln bei den ABA-Mikropartikeln eine kontinuierliche Freisetzung von EPO bis beispielsweise zum 29. Tag erzielt werden kann, insbesondere bei der Verwendung von BSA als Zuschlagstoff.

Vergleicht man die in vitro-Freisetzung von EPO aus PLGA (50 : 50)-Mikropartikeln und ABA-Mikropartikeln verschiedener Monomierzusammensetzungen mit einem Wirkstoffgehalt von 0,5% bzw. 3,4% — jeweils ohne Zusatzstoffe — so wird die Überlegenheit der erfindungsgemäßen ABA-Mikropartikel deutlich:

Tabelle 4B

Vergleich der In-vitro-Freisetzung von EPO aus PLGA- und ABA-Mikropartikeln mit unterschiedlichen Monomierzusetzungen bzw. unterschiedlichem Beladungsgrad ohne weitere Zusatzstoffe

Freisetzung in % / Tag (bezogen auf die in den MP vorhandene EPO-Gesamtmenge)

| Tag:                                   | 1    | 2    | 3   | 7    | 11   | 14   | 18  | 21  | 25   | 29  |
|----------------------------------------|------|------|-----|------|------|------|-----|-----|------|-----|
| MP aus Polymer<br>Beladungsgrad (in %) |      |      |     |      |      |      |     |     |      |     |
| PLGA (50:50) (0,5%)                    | 29   | -    | -   | -    | -    | -    | -   | -   | -    | -   |
| ABA (57:11:32) (0,5%)                  | 12,7 | 1,8  | 0,5 | 0,26 | 0,02 | -    | -   | -   | -    | -   |
| ABA (51:16:33) (0,5%)                  | 31   | n.b. | 1,6 | 0,7  | 0,4  | 0,1  | -   | -   | -    | -   |
| ABA (46:22:32) (0,5%)                  | 15   | n.b. | 3,2 | 1,0  | 0,5  | 0,2  | 0,1 | -   | -    | -   |
| ABA (51:16:33) (3,4%)                  | 11,7 | 2,2  | 1,8 | 0,8  | 0,2  | 0,17 | 0,2 | 0,2 | 0,13 | 0,1 |

n.b. = nicht bestimmt

Aus der Tabelle 4B ist zu entnehmen, daß bei geringem Beladungsgrad (0,5%) die Freisetzung aus ABA-Mikropartikeln auf 11–18 Tage begrenzt ist, wenn keine Zuschlagsstoffe zugesetzt werden. Im Falle der ABA-Triblock-Copolymeren ist im Verhältnis zu den PLGA-Mikropartikeln bei gleichem Beladungsgrad eine verlängerte Freisetzungsdauer festzustellen. Die Freisetzungsdauer verlängert sich bei einem höheren Gehalt von GA im ABA-Triblock-Copolymeren (s. o. längere Freisetzung bei steigendem Gehalt von GA von 11, 16 bzw. 22 Gew.-%).

#### Beispiel 5

In der folgenden Tabelle 5 werden die chemischen und physikalischen Eigenschaften einiger ABA-Blockpolymere in einer Übersicht zusammengestellt.

Tabelle 5

Übersicht der verwendeten ABA-Triblock-Copolymere

| Charge | LA/GA/PEG<br>% | MW<br>[Da] | Tg<br>[°C] | Polydispersität |
|--------|----------------|------------|------------|-----------------|
| 1      | 64/13/23       | 25.000     | 47.9       | 3.1             |
| 2      | 57/11/32       | 19.000     | 46.3       | 2.5             |
| 3      | 50/12/38       | 20.000     | 46.1       | 2.3             |
| 4      | 45/9/46        | 17.000     | 42.1       | 2.8             |
| 5      | 36/35/29       | 16.400     | 35.3       | 6.8             |
| 6      | 46/22/32       | 16.700     | 45.1       | 5.4             |
| 7      | 42/28/30       | 17.200     | 31.1       | 8.4             |
| 8      | 51/16/33       | 18.500     | 47.9       | 4.6             |
| 9      | 40/20/40       | 13.500     | 23.7       | 5.2             |

Die aus den in Tab. 5 angegebenen ABA-Triblock-Copolymere hergestellten EPO-haltigen MP wiesen Glasübergangstemperaturen (Tg) im Bereich von 27–45°C auf. Damit ist eine langfristige stabile Lagerung der MP im Kühlschrank (4–8°C) möglich.

## Abkürzungsverzeichnis:

MP: Mikropartikel  
 PLGA: Copolymer aus Milchsäure und Glykolsäure  
 5 LA: Milchsäure (lactic acid)  
 GA: Glykolsäure (glycolic acid)  
 ABA: Tripel-Blockcopolymer aus A- und B-Block  
 A-Block: Copolymer aus Milch- und Glykolsäure  
 B-Block: Polyethylenglykol (PEG)  
 10 BSA: bovines Serumalbumin  
 HSA: humanes Serumalbumin  
 PVA: Polyvinylalkohol  
 D40: Dextran 40 000

## Patentansprüche

1. Pharmazeutische Darreichungsformen in Form von Mikropartikeln bestehend aus einer einen Wirkstoff enthaltenden Polymermatrix, wobei das Polymer ein ABA-Triblock-Copolymer ist, dessen A-Block ein Copolymer aus Milch- und Glykolsäure und dessen B-Block eine Polyethylenglykol-Kette darstellt, **gekennzeichnet dadurch**, daß der Wirkstoff ein aggregationsempfindliches Polypeptid ist und die Mikropartikel Zuschlagstoffe enthalten, die ausgewählt sind aus der Gruppe Serumproteine, Polyaminosäuren, Cyclodextrine; Cyclodextrinderivate; Saccharide; Aminosucker; Aminosäuren; Detergenzien oder Carbonsäuren sowie Gemische dieser Zuschlagstoffe.

2. Pharmazeutische Darreichungsformen gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Zuschlagstoffe ausgewählt sind aus der Gruppe Serumalbumin; Polyaminosäuren; Aminosäuren; Saccharide; Cyclodextrinderivate und Detergenzien.

3. Pharmazeutische Darreichungsformen gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Zuschlagstoffe ausgewählt sind aus Gemischen von Dextranen und Polyaminosäuren; Gemischen aus Cyclodextrinen oder Cyclodextrinderivaten mit Aminosäuren; Gemischen von Cyclodextrin oder Cyclodextrinderivaten mit Polyaminosäuren; Gemischen von Cyclodextrinen oder Cyclodextrinderivaten mit Dextranen; oder aus Gemischen von Dextranen mit Aminosäuren.

4. Pharmazeutische Darreichungsformen gemäß einem der Ansprüche 1—3, dadurch gekennzeichnet, daß als Zuschlagstoffe in der Polymerphase Carbonsäuren enthalten sind.

5. Darreichungsformen gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß das ABA-Blockpolymer ein Molekulargewicht zwischen 5.000 bis 50.000 Dalton, vorzugsweise zwischen 10.000 bis 30.000, aufweist und eine Polydispersität von 1,1 bis 8,5, vorzugsweise von 1,5 bis 5,5 besitzt.

6. Darreichungsformen gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß der Polyethylenglykolanteil im ABA-Copolymer zwischen 20 bis 50 Gew.-%, bezogen auf die gesamte Polymermenge, vorzugsweise zwischen 30 bis 40 Gew.-% liegt.

7. Darreichungsformen gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß das Verhältnis von Milchsäure zu Glykolsäure im ABA-Copolymer zwischen 1 : 1 bis 5 : 1 liegt, vorzugsweise zwischen 1,5 : 1 bis 4,5 : 1.

8. Darreichungsformen gemäß Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß das Verhältnis von Milchsäure zu Glykolsäure etwa 4 : 1, vorzugsweise 2 : 1 beträgt.

9. Darreichungsformen gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Zuschlagstoffe in einer Menge von 0,5 bis 40 Gew.-% bezogen auf die Gesamtmikropartikelmenge, vorzugsweise von 1—30 Gew.-%, enthalten sind.

10. Darreichungsformen gemäß einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß sie als Polyaminosäuren Polyarginin oder Polyhistidin, insbesondere Poly-L-Arginin oder Poly-L-Histidin, enthalten, als Aminosäuren Arginin, Glycin, Phenylalanin, Glutaminsäure oder Lysin enthalten, als Saccharide, Trehalose, Saccharose, Maltose, Stärke, Maltodextrine, Raffinose, Alginat, Dextrane enthalten, als Aminosucker Chitosan oder als Detergenzien Tween 20®, Tween®, Pluronic® oder Miglyol® enthalten.

11. Darreichungsformen gemäß Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß sie als Dextrane solche mit einem Molekulargewicht zwischen 20.000 und 60.000, vorzugsweise 40.000, enthalten.

12. Darreichungsformen gemäß einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß sie als Zuschlagstoffe Gemische aus Dextranen mit Polyarginin oder Polyhistidin enthalten, vorzugsweise Gemische aus Dextran 40.000 mit Poly-L-Arginin oder Gemische aus Dextran 40.000 mit Poly-L-Histidin.

13. Darreichungsformen gemäß einem der Ansprüche 1—9, dadurch gekennzeichnet, daß sie als Zuschlagstoffe Serumproteine enthalten, vorzugsweise bovines oder humanes Serumalbumin.

14. Darreichungsformen gemäß einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß der Polypeptidgehalt in den Mikropartikeln zwischen 0,01% bis zu 5 Gew.-%, bezogen auf die Gesamtmikropartikelmenge, vorzugsweise zwischen 0,01% bis zu 3 Gew.-% beträgt.

15. Darreichungsformen gemäß einem der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß sie Erythropoietin als Polypeptid enthalten.

16. Verfahren zur Herstellung von Polypeptid-enthaltenden Mikropartikeln mit Hilfe des Tripelemulsionsverfahrens, umfassend die Schritte:

a) Lösen eines ABA-Triblock-Copolymeren, dessen A-Block ein Copolymer aus Milch- und Glykolsäure ist und dessen B-Block eine Polyethylenglykol-Kette darstellt, in einem organischen, nicht mit

- Wasser mischbaren Lösungsmittel, gegebenenfalls unter Zusatz einer Carbonsäure;
- b) Zugabe einer Lösung oder einer Suspension eines Polypeptides, wobei die Lösung oder Suspension weitere Zuschlagstoffe enthält, die ausgewählt sind aus der Gruppe Serumproteine, Polyaminosäuren; Cyclodextrine Cyclodextrinderivate; Saccharide; Aminosucker; Aminosäuren, Detergenzien sowie Gemische dieser Zuschlagstoffe, und Herstellung einer W/O-Emulsion in einem ersten Homogenisierungsschritt; 5
- c) Herstellen einer W/O/W-Emulsion in einem zweiten Homogenisierungsschritt durch Dispersion der erhaltenen W/O-Emulsion in einer Stabilisator-haltigen wäßrigen Lösung; und
- d) Verdunsten des Lösungsmittels und anschließender Isolierung der Mikropartikel.
17. Verfahren nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß im ersten Homogenisierungsschritt als 10 Homogenisator ein Ultra-Turrax eingesetzt wird und einmal 30 Sekunden oder zweimal 30 Sekunden, mit einer Pause von 30 Sekunden dazwischen, dispergiert wird.
18. Verfahren nach Anspruch 16 oder 17, dadurch gekennzeichnet, daß ein Volumenverhältnis Wasser/orga- nische Phase von 20—25% gewählt wird.
19. Verwendung von pharmazeutischen Zuschlagstoffen ausgewählt aus der Gruppe Serumproteine, Poly- 15 aminosäuren; Cyclodextrine; Saccharide; Aminosucker; Aminosäuren; Detergenzien oder Carbonsäuren sowie Gemische dieser Zuschlagsstoffe zur Vermeidung der Aggregatbildung von aggregationsempfindli- chen Polypeptiden bei der Herstellung von Polypeptid enthaltenden Mikropartikeln.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

- Leerseite -